

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-066047

(43)Date of publication of application : 05.03.2003

(51)Int.Cl.

G01N 33/536

G01N 33/53

G01N 33/577

(21)Application number : 2001-368286

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 03.12.2001

(72)Inventor : KAMEI AKIHITO  
GONJO NORIKO  
KAWAMURA TATSURO  
HIRAI MASATO

(30)Priority

Priority number : 2001179710

Priority date : 14.06.2001

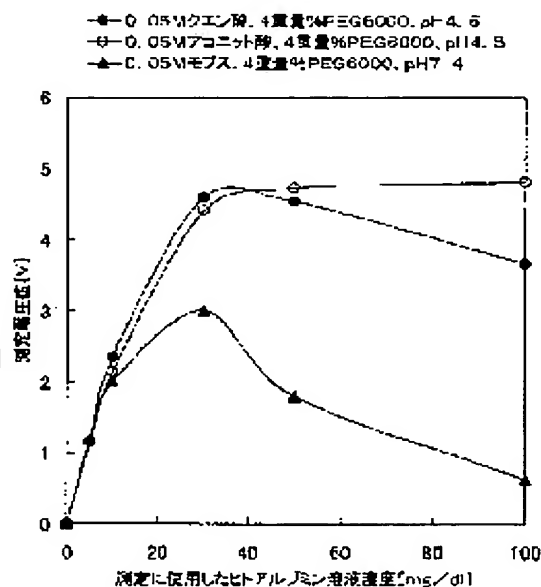
Priority country : JP

## (54) IMMUNE REACTION MEASURING METHOD AND IMMUNE REACTION MEASURING REAGENT USED THEREFOR

### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an immune reaction measuring method effective for improvement in measuring value and also effective for moderation of a zone phenomenon caused in an antigen excessive area, and an immune reaction measuring reagent used therefor.

SOLUTION: This immune reaction measuring method for measuring an antigen or antibody that is a measuring material contained in a sample comprises a process A for adding a tricarboxylic acid or salt thereof and the antibody or antigen that is a specifically bonding material specifically bonded to the measuring material to the sample; and a process B for detecting an antigen-antibody composite body generated by the antigen-antibody reaction of the measuring material with the specifically bonding material in a reaction system containing the sample, the specifically bonding material and the tricarboxylic acid or salt thereof, which is formed in the process A, wherein pH of the reaction system being set acidic.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

24.02.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than  
the examiner's decision of rejection or  
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-66047

(P2003-66047A)

(43) 公開日 平成15年3月5日(2003.3.5)

| (51) Int.Cl. <sup>7</sup> | 識別記号 | F I            | テマコード(参考) |
|---------------------------|------|----------------|-----------|
| G 0 1 N 33/536            |      | G 0 1 N 33/536 | F         |
| 33/53                     |      | 33/53          | D         |
| 33/577                    |      | 33/577         | B         |

審査請求 未請求 請求項の数22 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2001-368286(P2001-368286)  
(22) 出願日 平成13年12月3日(2001.12.3)  
(31) 優先権主張番号 特願2001-179710(P2001-179710)  
(32) 優先日 平成13年6月14日(2001.6.14)  
(33) 優先権主張国 日本(J P)

(71) 出願人 000005821  
松下電器産業株式会社  
大阪府門真市大字門真1006番地  
(72) 発明者 亀井 明仁  
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内  
(72) 発明者 権丈 紀子  
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内  
(74) 代理人 100097445  
弁理士 岩橋 文雄 (外2名)

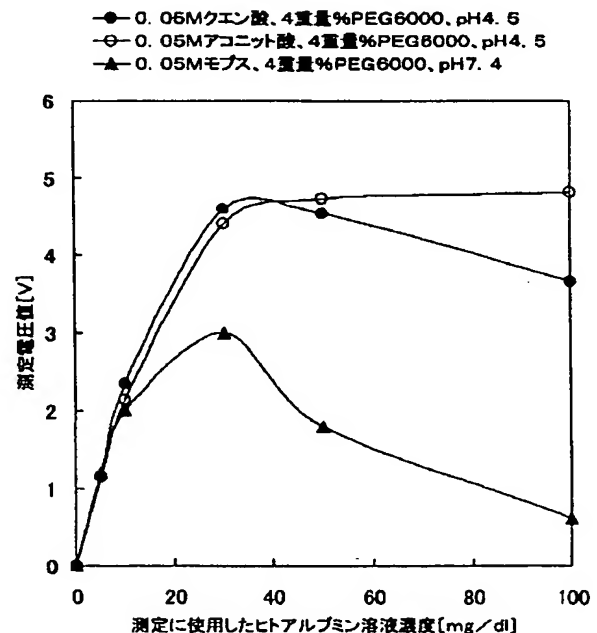
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫反応測定方法及びそれに用いる免疫反応測定用試薬

(57) 【要約】

【課題】 測定値の向上に効果があり、抗原過剰領域で生じる地帯現象の緩和にも効果を示す免疫反応測定方法及びそれに用いる免疫反応測定用試薬を提供する。

【解決手段】 試料中に含まれる被測定物質である抗原または抗体を測定する方法であって、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩、及び被測定物質に対して特異的に結合する特異結合物質である抗体または抗原を試料に添加する工程A、並びに工程Aにより構成された、試料、特異結合物質及びトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む反応系において、被測定物質と特異結合物質との抗原抗体反応により生じた抗原-抗体複合体を検出する工程Bを含み、反応系のpHが酸性に設定される、免疫反応測定方法。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 試料中に含まれる被測定物質である抗原または抗体を測定する方法であって、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩、及び前記被測定物質に対して特異的に結合する特異結合物質である抗体または抗原を前記試料に添加する工程 A、並びに前記工程 A により構成された、前記試料、前記特異結合物質及び前記トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む反応系において、前記被測定物質と前記特異結合物質との抗原抗体反応により生じた抗原-抗体複合体を検出する工程 B を含

み、かつ前記抗原抗体反応が生じるときの前記反応系の pH が酸性に設定されていることを特徴とする免疫反応測定方法。

【請求項 2】 反応系にさらに緩衝剤を添加することを特徴とする、請求項 1 記載の免疫反応測定方法。

【請求項 3】 反応系の pH が 4～6 に設定されていることを特徴とする、請求項 1 または 2 記載の免疫反応測定方法。

【請求項 4】 反応系におけるトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度が 0.3 M 以下であることを特徴とする、請求項 1～3 のいずれかに記載の免疫反応測定方法。

【請求項 5】 トリカルボン酸がクエン酸またはアコンニッ酸であることを特徴とする、請求項 1～4 のいずれかに記載の免疫反応測定方法。

【請求項 6】 反応系がポリエチレングリコールを 2～6 重量%含むことを特徴とする、請求項 1～5 のいずれかに記載の免疫反応測定方法。

【請求項 7】 抗原-抗体複合体が凝集複合体であることを特徴とする、請求項 1～6 のいずれかに記載の免疫反応測定方法。

【請求項 8】 工程 B において、凝集複合体に起因する光学的变化量を測定することにより、前記凝集複合体を検出することを特徴とする、請求項 7 記載の免疫反応測定方法。

【請求項 9】 抗原が、その分子構造内に金属イオンを保持しており、前記抗原に対して特異的に結合する抗体が、前記抗原から前記金属イオンが脱離したときに、前記金属イオンを保持していない前記抗原とも特異的に結合することを特徴とする、請求項 1～8 のいずれかに記載の免疫反応測定方法。

【請求項 10】 抗原が、少なくとも 1 種類の抗体に対して複数の結合部位を持つ物質であり、抗体が、前記抗原の前記複数の結合部位に結合するモノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 1～9 に記載の免疫反応測定方法。

【請求項 11】 抗原がヒトアルブミンであることを特徴とする、請求項 1～8 のいずれかに記載の免疫反応測定方法。

【請求項 12】 抗原がヒト C 反応性蛋白質であること

を特徴とする、請求項 1～10 のいずれかに記載の免疫反応測定方法。

【請求項 13】 請求項 1 記載の免疫反応測定方法に用いる免疫反応測定用試薬であって、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩、及び被測定物質に対して特異的に結合する特異結合物質である抗体または抗原を含み、前記被測定物質と前記特異結合物質との抗原抗体反応が生じるときの pH が酸性になるように調製されたことを特徴とする免疫反応測定用試薬。

【請求項 14】 さらに緩衝剤を含むことを特徴とする、請求項 13 記載の免疫反応測定用試薬。

【請求項 15】 抗原抗体反応が生じるときの pH が 4～6 に設定されるように調製されたことを特徴とする、請求項 13 または 14 記載の免疫反応測定用試薬。

【請求項 16】 抗原抗体反応が生じるときのトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度が 0.3 M 以下になるように調製されたことを特徴とする、請求項 13～15 のいずれかに記載の免疫反応測定用試薬。

【請求項 17】 トリカルボン酸がクエン酸またはアコンニッ酸であることを特徴とする、請求項 13～16 のいずれかに記載の免疫反応測定用試薬。

【請求項 18】 さらにポリエチレングリコールを含み、抗原抗体反応が生じるときの前記ポリエチレングリコールの濃度が 2～6 重量%であることを特徴とする、請求項 13～17 のいずれかに記載の免疫反応測定用試薬。

【請求項 19】 抗原が、その分子構造内に金属イオンを保持しており、前記抗原に対して特異的に結合する抗体が、前記抗原から前記金属イオンが脱離したときに、前記金属イオンを保持していない前記抗原とも特異的に結合することを特徴とする、請求項 13～18 のいずれかに記載の免疫反応測定用試薬。

【請求項 20】 抗原が、少なくとも 1 種類の抗体に対して複数の結合部位を持つ物質であり、前記抗原に対して特異的に結合する抗体が、前記抗原の前記複数の結合部位に結合するモノクローナル抗体であることを特徴とする、請求項 13～19 のいずれかに記載の免疫反応測定用試薬。

【請求項 21】 抗原がヒトアルブミンであることを特徴とする、請求項 13～18 のいずれかに記載の免疫反応測定用試薬。

【請求項 22】 抗原がヒト C 反応性蛋白質であることを特徴とする、請求項 13～20 のいずれかに記載の免疫反応測定用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中に含まれる被測定物質である抗原または抗体を測定することができる免疫反応測定方法及びそれに用いる免疫反応測定用試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】医療分野では、様々な疾患の診断および病状の経過を調べるために、ヒトの体液中に存在する各疾患に特徴的な蛋白質の含有量を調べる事が広く利用されている。

【0003】これらの蛋白質の含有量測定には、主として、特異性の高い抗原抗体反応を利用した免疫反応測定方法が広く用いられており、現在では、免疫反応測定方法にも様々な原理を利用したものが開発され、利用されている。

【0004】それらの中でも、比濁法、比濁法、スライド凝集法などの抗原と抗体の反応により生じる凝集複合体を検出する測定方法はよく知られたものである。これらは、溶液中に抗原および抗体が一様に分散された状態で行うものであるため、均一系の免疫反応測定方法と総称される。

【0005】これらの反応では、凝集複合体の生成により、反応系は抗原および抗体量に依存した濁りを生じる。比濁法、比濁法はこれを光学的に測定する方法であり、比濁法は反応系で散乱された光量をもとに、比濁法は反応系での散乱により減少した透過光量をもとに測定する方法である。一般的に両方法の測定対象としては、同一の反応系を用いることができ、いずれか一方で測定できる対象は残りの一方でも測定することができる。スライド凝集法は凝集複合体の生成により生じた濁りを、スライドガラス上などで目視などにより判定する方法であり、反応系は比濁法、比濁法と同一のものをを用いることができる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】上記従来の均一系の免疫反応測定方法では、抗原抗体反応を促進させ、微量成分を高感度に測定するために様々な添加剤を用いることが試みられている。よく知られている例としては、反応系にポリエチレングリコール、デキストラン、ポリビニルピロリドン、ポリ塩化ビニルなどの水溶性高分子を混在させ、抗原抗体反応による凝集複合体の形成を促進させ、反応時間および測定感度を向上させる方法が挙げられる。これらの水溶性高分子の中でもポリエチレングリコールが比較的低濃度でも効果が高いことが知られており、平均分子量が6,000のポリエチレングリコールを2~6重量%の濃度で使用方法が広く用いられており、特に4重量%濃度が、非特異的な混濁が少なく、効果が高いとされている。

【0007】水溶性高分子の抗原抗体反応に対する促進効果は一般に分子量が大きく、高濃度であるほど大きい傾向がある(Automated Immunoanalysis Part I, Ritchie編、第67-112頁(1978)参照)。

【0008】抗原抗体反応の測定を考えた場合、抗原抗体反応の程度すなわち抗原の濃度に依存した信号強度は

高い程、良好なS/N比を維持することができ、安定した測定を行うことができる。しかし、抗原抗体反応の更なる促進によって、上記効果を得ようとした場合、従来の水溶性高分子の添加では、より高濃度あるいは、高分子量の水溶性高分子を添加する必要があるが、水溶性高分子を溶解した溶液の粘性が増大するため、その分析操作上の取り扱いが困難になるという問題点があった。

【0009】また、均一系の免疫反応測定方法においては、地帯現象と呼ばれる現象が一般に知られている。地帯現象とは、抗原と抗体が最大の凝集複合体を形成する当量域よりも、いずれかが過剰に存在する場合に、凝集複合体が生じ難くなる現象のことである。多価抗体と2価以上の抗原との間の結合反応は、Heidelbergらの格子説が有名であり、Fundamental Immunology, William E. Paul編、(1984)(邦訳 基礎免疫学、多田富雄監訳、第714-716頁(1987))にその詳細な記載がある。

【0010】実際の均一系の免疫反応測定においては、抗体を用いて抗原濃度を測定する場合が多く、また、測定値についても抗原濃度が低値の場合よりも高値の場合に重要な意味を持つ場合が多いため、抗原過剰による地帯現象が問題となる場合が多い。地帯以外の領域では、抗体と抗原が交互に結合した複合体よりなる巨大な分子鎖が生じ、その量や大きさは、抗体濃度を一定とすると、抗原濃度に依存して増加するため、この分子鎖の量や大きさを光学的な変化量として測定することにより、抗原濃度を定量的に捉えることができる。また、抗原-抗体複合体は、抗体および抗原の濃度によっては、溶液中の濁りや凝集物として肉眼でも十分に確認が可能なものとなるため、目視などにより定性的な判定を行うことができる。

【0011】しかしながら、抗原過剰域では抗原が抗体に比べて過剰に存在するため、結合部位が抗原により飽和された抗体の量が増加する。このため、先に述べたような分子鎖が生じ難くなり、反応結果が、抗原が低濃度の場合と区別が付き難くなる。従って、抗原濃度に依存した正しい定量や判定が行えず、また、これを回避するためには、測定濃度範囲が制限されるという問題点があった。

【0012】本発明は上記従来の問題点に鑑み、容易に測定値の向上が可能な免疫反応測定方法及びそれに用いる免疫反応測定用試薬を提供することを目的とする。さらに、抗原過剰領域で生じる地帯現象を緩和することができる免疫反応測定方法及びそれに用いる免疫反応測定用試薬を提供することも目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するために、本発明の免疫反応測定方法は、試料中に含まれる被測定物質である抗原または抗体を測定する方法であつ

て、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩、及び前記被測定物質に対して特異的に結合する特異結合物質である抗体または抗原を前記試料に添加する工程A、並びに前記工程Aにより構成された、前記試料、前記特異結合物質及び前記トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む反応系において、前記被測定物質と前記特異結合物質との抗原抗体反応により生じた抗原-抗体複合体を検出する工程Bを含み、かつ前記抗原抗体反応が生じるときの前記反応系のpHが酸性に設定されていることを特徴とする。

【0014】また、本発明の免疫反応測定用試薬は、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩、及び被測定物質に対して特異的に結合する特異結合物質である抗体または抗原を含み、前記被測定物質と前記特異結合物質との抗原抗体反応が生じるときのpHが酸性になるように調製されたことを特徴とする。

【0015】

【発明の実施の形態】本発明は、容易に測定値の向上が可能な免疫反応測定方法及びそれに用いる免疫反応測定用試薬に関する。また、抗原過剰領域で生じる地帯現象を緩和することができる免疫反応測定方法及びそれに用いる免疫反応測定用試薬に関する。

【0016】本発明者らは、抗原抗体反応時に、反応系にトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を付加し、反応系のpHを酸性に保つことにより、抗原抗体の結合による免疫反応の測定値を向上させ得ること、また、これにより抗原過剰領域で生じる地帯現象が緩和できることを見出した。

【0017】本発明の一実施の形態における免疫反応測定方法は、試料中に含まれる被測定物質である抗原または抗体を測定する方法であって、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩、及び前記被測定物質に対して特異的に結合する特異結合物質である抗体または抗原を前記試料に添加する工程A、並びに前記工程Aにより構成された、前記試料、前記特異結合物質及び前記トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む反応系において、前記被測定物質と前記特異結合物質との抗原抗体反応により生じた抗原-抗体複合体を検出する工程Bを含み、かつ前記抗原抗体反応が生じるときの前記反応系のpHが酸性に設定されていることを特徴とする。ここで、反応系にトリカルボン酸とトリカルボン酸の塩の両方を含んでいてもよい。また、反応系に含まれるトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩により緩衝能が与えられ、反応系のpHが酸性に設定されることが好ましい。このようにすると、反応系のpHを酸性に設定するために他の緩衝剤をさらに添加する必要がなく、かつ上記免疫反応の測定値向上の効果を効率的に発揮させることができ、また、これによる抗原過剰領域で生じる地帯現象の緩和効果を効率的に発揮させることができる。反応系に含まれるトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩によ

り緩衝能が与えられるようにするため、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度が0.01M以上であることが好ましい。また、反応系にさらに緩衝剤を添加してもよい。

【0018】また、本発明の一実施の形態における免疫反応測定用試薬は、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩、及び被測定物質に対して特異的に結合する特異結合物質である抗体または抗原を含み、前記被測定物質と前記特異結合物質との抗原抗体反応が生じるときのpHが酸性になるように調製されたことを特徴とする。ここで、トリカルボン酸とトリカルボン酸の塩の両方を含んでいてもよい。また、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩により緩衝能が与えられ、被測定物質と特異結合物質との抗原抗体反応が生じるときのpHが酸性になるように調製されていることが好ましい。また、さらに緩衝剤を含んでいてもよい。

【0019】本発明の免疫反応測定方法及び免疫反応測定用試薬で用いられる緩衝剤は、当該分野で公知のものをを用いることができ、例えば、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウムなどからなるリン酸系の緩衝剤、酢酸ナトリウム、カコシル酸ナトリウム、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸、コハク酸などが挙げられる。この場合、含まれるべき緩衝剤の量は、用いる緩衝剤の種類、被測定対象物を含む試料(検体)の量、および反応系に対する被測定物質である抗原または抗体に対する抗体または抗原の供給方法などに応じて、本発明の効果が得られるように調整すればよい。

【0020】また、本発明の免疫反応測定方法において、反応系のpHが4~6に設定されていることが好ましい。上記pH範囲では、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩による免疫反応の測定値向上効果が高くなり、また、これによる抗原過剰領域で生じる地帯現象の緩和効果が高くなる。上記効果の観点から、反応系のpHが4.5に調整されていることが特に好ましい。

【0021】本発明の免疫反応用試薬において、上記理由により、抗原抗体反応が生じるときのpHが4~6に設定されるように調製されていることが好ましく、pHが4.5に設定されるように調製されていることがより好ましい。

【0022】本発明の免疫反応測定方法において、反応系におけるトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度が0.3M以下であることが好ましい。このようにすると、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩による、免疫反応の測定値向上効果が高くなり、また、これによる抗原過剰領域で生じる地帯現象の緩和効果もより高くなる。反応系におけるトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度が0.2M以下の場合、それら効果がより高くなるためより好ましく、0.1M以下の場合、それら効果がさらに高いため特に好ましい。

【0023】本発明の免疫反応用試薬において、上記理

由により、抗原抗体反応が生じるときのトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度が0.3M以下になるように調製されていることが好ましく、0.2M以下になるように調製されていることがさらに好ましく、0.1M以下になるように調製されていることが特に好ましい。

【0024】本発明の免疫反応測定方法及び免疫反応用試薬で用いられるトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩としては、クエン酸、イソクエン酸、アコニット酸及びこれらの塩が挙げられる。これらは、無水クエン酸、クエン酸一水和物、クエン酸三ナトリウム、クエン酸三ナトリウム二水和物、クエン酸二水素カリウム、クエン酸三カリウム一水和物、クエン酸三アンモニウム、クエン酸水素二アンモニウム、クエン酸カルシウム四水和物、クエン酸マグネシウム九水和物、クエン酸リチウム四水和物、クエン酸銅(II)2.5水和物、DL-イソクエン酸三ナトリウム、trans-アコニット酸、cis-アコニット酸無水物などの形態で市販されており、これらを単独または組み合わせて使用することができる。これらの中でも、比較的安価で、室温保存が可能で、安定性が高いものを入手することができ、使い易いという観点から、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩が、クエン酸、クエン酸の塩、アコニット酸、またはアコニット酸の塩であることが好ましく、さらに前記アコニット酸がtrans-アコニット酸であることが好ましい。

【0025】また、本発明の免疫反応測定方法の反応系及び免疫反応用試薬には、その用途などに応じて、本発明の効果が得られる範囲で、当該分野で公知である他の任意の成分が付加され得る。例えば、比濁法、比濁法、スライド凝集法などの均一系の免疫反応測定法に適用する場合には、本発明の免疫反応測定方法の反応系及び免疫反応用試薬にポリエチレングリコールを付加し得る。その含有量は、非特異的凝集が少なく、測定感度向上の効果が大きいという観点から、本発明の免疫反応測定方法においては、反応系に対して2~6重量%濃度であることが好ましく、4重量%濃度であることがさらに好ましい。同様に、本発明の免疫反応用試薬においては、抗原抗体反応が生じるときの濃度が2~6重量%であることが好ましく、4重量%濃度であることがさらに好ましい。

【0026】また、抗原または抗体の自己凝集による非特異的混濁を低減するために、本発明の免疫反応測定方法の反応系及び免疫反応用試薬にトゥイーン20、オクチルグルコシド、ラウリル硫酸ナトリウム(SDS)、スクロースモノラウレート、CHAPSなどの界面活性剤を付加し得る。その含有量は、抗原抗体反応の阻害が少ないという観点から、本発明の免疫反応測定方法においては、反応系に対して0.3%以下であることが好ましく、0.1%以下であることがさらに好ましい。同様

に、本発明の免疫反応用試薬においては、その含有量は、抗原抗体反応が生じるときの濃度が0.3%以下であることが好ましく、0.1%以下であることがさらに好ましい。

【0027】本発明の免疫反応測定方法及び免疫反応測定用試薬が適用される測定系は特に限定されないが、特に、抗原過剰領域で生じる地帯現象を有する比濁法、比濁法、スライド凝集法などの均一系の測定系に対して、より高い効果が期待できるため好ましい。特に自動測定機器による測定が普及している比濁法、比濁法に適用した場合、抗原過剰領域で生じる地帯現象の判定に要する工程を削減あるいは簡略化できるため特に好ましい。

【0028】本発明の免疫反応測定方法において、抗原-抗体複合体が凝集複合体であることが好ましい。また、工程Bにおいて、凝集複合体に起因する光学的变化量を測定することにより、前記凝集複合体を検出することが好ましく、光学的变化量が、光散乱強度または透過光量の変化量であることがさらに好ましい。

【0029】本発明の免疫反応測定方法及び免疫反応測定用試薬の被測定物質である抗原または抗体は特に限定されず、一般に抗原抗体反応を利用して測定できる物質であればいずれでもよく、例えば、蛋白質、核酸、脂質、細菌、ウィルス、ハプテンなどが挙げられる。この中で、蛋白質は抗原抗体反応を用いた臨床検査上の主たる測定対象であるため好ましい。蛋白質として例えば、LH(黄体形成ホルモン)、FSH(卵胞刺激ホルモン)、hCG(絨毛性腺刺激ホルモン)などのホルモンや、各種免疫グロブリンクラスやサブクラス、補体成分、各種感染症のマーカー、CRP、アルブミン、リウマチ因子、血液型抗原などが挙げられる。この中で、被測定物質がヒトアルブミンまたはヒトC反応性蛋白質(以下、ヒトCRPと略す)であることが好ましい。

【0030】トリカルボン酸及びトリカルボン酸の塩はキレート作用を持っており、反応系に存在するCa<sup>2+</sup>やFe<sup>2+</sup>などの二価及び三価の金属イオンを効率的に奪う性質がある。このため、抗原が、その分子構造内に金属イオンを保持している場合、前記抗原に対して特異的に結合する抗体が、前記抗原から前記金属イオンが脱離したときに、前記金属イオンを保持していない前記抗原とも特異的に結合することが好ましい。このようにすると、抗原が、分子構造内に金属イオンを保持し、前記金属イオンの脱離により前記分子構造に変化を生じる物質であっても、測定を行うことができる。

【0031】また、抗原が、その分子構造内に金属イオンを保持し、前記金属イオンの脱離により前記分子構造に変化を生じる物質である場合、抗原が保持しているものと同じ金属イオンを反応系に添加し、反応系において抗原抗体反応が生じるときに反応系内に上記金属イオンが存在するようにしてもよい。

【0032】添加する金属イオンの量は、使用するトリ

カルボン酸またはトリカルボン酸の塩のキレート能、その濃度、抗原が持つ金属イオンの保持能などにに基づき設定すればよい。

【0033】分子構造内に金属イオンを保持している抗原としてはCRPがあり、 $Ca^{2+}$ の保持の有無によって構造変化を生じる。本発明の免疫反応測定方法及び免疫反応測定用試薬の抗原がヒトCRPである場合であって、 $Ca^{2+}$ を未保持のヒトCRPに対して結合しない抗体を含むヤギ抗ヒトCRPポリクローナル抗体を用い、トリカルボン酸としてクエン酸を用いたときには、0.02 Mのクエン酸に対して、0.02 Mの $Ca^{2+}$ を反応系に添加することが好ましい。

【0034】また、抗原が、少なくとも1種類の抗体に対して複数の結合部位を持つ物質である場合、抗体は前記抗原の前記複数の結合部位に結合するモノクローナル抗体であることが好ましい。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ細胞株により産生される。ハイブリドーマ細胞株は、抗体を産生するB細胞と骨髓腫瘍細胞（ミエローマ細胞）を細胞融合することにより得られた抗体産生能と強い増殖能を併せ持つ融合細胞集団より一つの細胞のみを分離し、増殖させて確立したものであるため、これらが産生する抗体の性状は同じである。また、ハイブリドーマ細胞株は増殖能が強く、凍結保存が可能であるため、適切な管理をしていれば尽きることがなく、ハイブリドーマ細胞株を培養液あるいは腹腔中で培養し、精製することにより永久に、同じ性状の抗体を得続けることができる。一方ポリクローナル抗体は、動物に抗原を投与し、血中に抗原に結合する抗体を多量に出現させ、この血液の全部あるいは一部を採取し、精製することにより得られるため、その性質は動物の個体差、生育環境、状態などに依存する。このため、同一性状の抗体を得続けることが困難である。このように、モノクローナル抗体を使用することにより、常に同じ性状の抗体を使用することが可能となり、試薬としての抗体の供給が安定し、結果として、免疫反応測定方法及び免疫反応測定用試薬による免疫反応測定結果の安定化を図ることができる。

【0035】本発明の免疫反応測定方法及び免疫反応測定用試薬に用いられる抗体は特に限定されず、抗原と特異結合するものであれば、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDのいずれのクラスの抗体であってもよい。この中で、IgG抗体が非特異的な反応が少なく、また、比較的市販されているものも多く、入手も容易であるため好ましい。また、抗体の由来動物種に関しても、特に限定されないが、ウサギ、ヤギ、マウス由来の抗体が比較的入手も容易であり、使用例も多いため好ましい。

【0036】本発明の免疫反応測定方法は、代表的には、以下のようにして行うことができる。トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を、反応系のpHを酸性

に、好ましくは、pHが4～6までの間に、より好ましくはpHが4.5に保たれるように緩衝剤が含まれた緩衝液に付加する。トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度は、抗原抗体反応時の濃度が0.3 M以下、好ましくは0.2 M以下、特に好ましくは0.1 M以下の濃度になるように付加する。トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩が緩衝剤を兼ねていてもよい。被測定物質である抗原または抗体に対する抗体または抗原を含有する溶液あるいは試料（検体）のいずれか一方を上記緩衝液と混合し、続いて残りの一方を混合することにより反応系を構成し、その反応系において生じた免疫反応を測定する。

【0037】トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を付加する方法、反応系のpHを酸性に保つために緩衝剤を付加する方法、及び反応系のpHを調整する方法は上記に限定されず、例えば、被測定物質である抗原または抗体に対する抗体または抗原を含有する溶液中に、あらかじめ上記要件を満たすように、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩及び緩衝剤を存在させておいてもよい。

【0038】本発明の免疫反応用試薬は、代表的には、以下のようにして作製し得る。

【0039】被測定物質である抗原または抗体に対する抗体または抗原と、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩とをそれぞれ別に調製する場合は、次のようになる。被測定物質である抗原または抗体に対する抗体または抗原を含有する溶液は、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の効果が得られる限り任意の組成であってよい。トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む溶液は、抗原抗体反応時のpHを酸性に保つために必要な緩衝能を持たせられるように、好ましくはpHが4～6までの間に、より好ましくはpHが4.5に保たれるように、また、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の抗原抗体反応時の濃度が0.3 M以下、好ましくは0.2 M以下、特に好ましくは0.1 M以下の濃度になるように、緩衝剤及びトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度を調整し、これらを純水に溶解することにより作製する。上記要件が満たされていれば、緩衝剤、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩は、それぞれ別々の溶液中に存在していてもよい。また、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩が緩衝剤を兼ねていてもよい。

【0040】また、被測定物質である抗原または抗体に対する抗体または抗原を含有する溶液中に、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を存在させておいてもよく、その場合は、上記で示した要件を満たすように、調製したトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む溶液で、被測定物質である抗原または抗体に対する抗体または抗原を含有する溶液を、透析あるいはゲルろ過して低分子成分を置換することにより、トリカルボン酸ま



たはトリカルボン酸の塩を含ませるようにすればよい。

【0041】以上説明したように、本発明の免疫反応測定方法及び免疫反応測定用試薬によれば、免疫反応の反応系にトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を存在させ、反応系のpHを酸性に設定したことにより、抗原抗体の結合による免疫反応の測定値を向上させることができ、また、これにより抗原過剰領域で生じる地帯現象を緩和することができる。従来の水溶性高分子を添加する方法では、抗原抗体反応の測定において、測定値を向上させ良好なS/N比を維持し安定した測定を行うために、より高濃度あるいは高分子量の水溶性高分子を添加する必要があり、溶液の粘性を増大させ、その分析操作上の取り扱いが困難になるという課題があったが、本発明において用いるトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩は低分子物質であるため、溶液の粘性を増大せず、その分析操作上の取り扱いも容易となる。

【0042】また、抗原過剰領域で生じる地帯現象を緩和し、被測定物質の高濃度での測定値の落ち幅を軽減したことにより、測定値が高く陽性と判定される領域を広げることが可能となり、測定濃度範囲を広げることができる。

【0043】

【実施例】以下、実施例を用いて本発明を説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

【0044】（実施例1）以下で、ヒトアルブミンを被測定物質とした場合の試薬の構成方法を示す。本実施例では、スライド凝集法、比濁法及び比濁法による測定に使用することが可能な、抗体溶液及びトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む緩衝液からなる試薬の調製方法について述べる。

【0045】以下に示した緩衝液などの調製には、Milli-Q SP TOC (Millipore社製) でろ過した純水を使用した。また、以下で特に記載の無い塩、緩衝剤などの試薬は、いずれも和光純薬工業製のものを入手し、ポリエチレングリコール6000、trans-アコニット酸は1級試薬を、それ以外のものは特級試薬を使用した。

【0046】まず、抗体溶液の調製を行った。ウサギ抗ヒトアルブミンポリクローナル抗体は、ヒトアルブミンを免疫したウサギより採取した抗血清より、プロテインAカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。カラムに充填したプロテインA固定化ゲルは、アマシャム・ファルマシア製のものを使用した。精製に用いた平衡化緩衝液には、1.5Mグリシン、3.0M NaCl、pH 8.9の組成のものを使用し、溶出緩衝液には、0.1Mクエン酸、pH 4.0の組成のものを使用した。精製は次のようにして行った。カラムに充填したゲル容量の5倍の平衡化緩衝液を流してカラムを平衡化した後、カラム全結合容量の10～20%の抗体を含む抗血清を平衡化緩衝液で容量を2倍に希釈してカラムに流し、血

清中の抗体をプロテインAに結合させた。続いて、平衡化緩衝液をプロテインAに吸着しない血清成分がカラムより出てこなくなるまで流し、カラムを洗浄した。続いて、カラムに溶出緩衝液を流し、プロテインAに結合した抗体を溶出した。溶出した抗体分画を分画分子量1万の透析チューブに入れ、約100倍容量の0.05M 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(Dojin製、以下モブスと略称する)、0.15M NaCl、0.04重量% NaN<sub>3</sub>、pH 7.4の組成の緩衝液で数回透析して、緩衝液成分を置換した。続いて、抗体濃度を280nmの吸光度測定により推定し、透析で用いたものと同じ緩衝液で調整して抗体濃度を3.0mg/mlとし、これを抗体溶液とした。抗体濃度は、特にこれに限定されるものではない。作製した抗体溶液は室温でも保存することができるが、抗体の変性防止の点からは、より低温保存が好ましく、4℃で保存することがより好ましい。

【0047】トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む緩衝液の調製は次のようにして行った。トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩には、クエン酸及びtrans-アコニット酸を使用し、2種類の緩衝液を構成した。

【0048】クエン酸を用いた緩衝液の構成方法は次のようにした。最終濃度で、クエン酸一水和物を0.05M、ポリエチレングリコール6000を4重量%になるように計量し、調製目的体積の約90%の純水で溶解した。これにNaOH水溶液を添加してpHを4.5に調整し、純水で目的体積に調整した。作製した緩衝液は室温保存した。

【0049】trans-アコニット酸を用いた緩衝液の構成方法は次のようにした。最終濃度で、trans-アコニット酸が0.05M、ポリエチレングリコール6000を4重量%になるように計量し、調製目的体積の約90%の純水で溶解した。これにNaOH水溶液を添加してpHを4.5に調整し、純水で目的体積に調整した。作製した緩衝液は室温保存した。

【0050】以上のように構成したトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む緩衝液の少なくとも一方を抗体溶液と組み合わせることにより、免疫反応用試薬を構成することができる。

【0051】（実施例2）次に、ヒトCRPを被測定物質とした場合の試薬の構成方法を示す。ヒトCRPは、同一の構造を持つ5個のサブユニットからなる構造を持つため、1種類の抗体に対して複数の結合部位を持つ物質である。このため、1種類の抗CRPモノクローナル抗体を使用することによっても、均一系の免疫反応測定に使用される試薬を構成することができる。モノクローナル抗体の種類は2種類以上であってもよい。

【0052】このため本実施例では、ポリクローナル抗体溶液とモノクローナル抗体溶液を、それぞれ用いた2

種類の抗体溶液及びトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む緩衝液からなる試薬を調製した。

【0053】まず、ポリクローナル抗体溶液を用いた試薬の調製方法を示す。抗体溶液は次のように調製した。ヤギ抗ヒトCRPポリクローナル抗体は、ヒトCRPを免疫したヤギより採取した抗血清より、プロテインGカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。カラムに充填したプロテインG固定化ゲルは、アマシヤム・ファルマシア製のものを使用した。精製に用いた平衡化緩衝液には、0.02M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、pH 7.0の組成のものを使用し、溶出緩衝液には、0.1Mグリシン、pH2.7の組成のものを使用した。カラムクロマトグラフィーによる精製法、透析による緩衝液の置換方法については、実施例1と同様の方法を用いた。続いて、抗体濃度を280nmの吸光度測定により推定し、透析で用いたものと同じ緩衝液で調整して抗体濃度を1.0mg/mlとし、これを抗体溶液とした。

【0054】ヒトCRPは $\text{Ca}^{2+}$ の保持の有無によって構造変化を生じるため、試薬を構成する抗体に $\text{Ca}^{2+}$ を未保持のヒトCRPに対して結合しない抗体が含まれる場合、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩によるキレート作用により、 $\text{Ca}^{2+}$ を未保持のヒトCRPの増加により、抗原抗体反応の反応率の低下が生じる可能性がある。上記で調製した抗体溶液は、ポリクローナル抗体であるため、 $\text{Ca}^{2+}$ を未保持のヒトCRPに対して結合しない抗体が含まれる。そのため、以下に示すトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む緩衝液の調製では、ヒトCRPの構造を保つため、緩衝液に $\text{Ca}^{2+}$ を添加した。

【0055】トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む緩衝液の調製は次のようにして行った。トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩には、クエン酸を使用した。

【0056】クエン酸を用いた緩衝液の構成方法は次のようにした。最終濃度で、クエン酸一水和物を0.02M、 $\text{CaCl}_2$ を0.02M、ポリエチレングリコール6000を4重量%になるように計量し、調製目的体積の約90%の純水で溶解した。これにNaOH水溶液を添加してpHを4.5に調整し、純水で目的体積に調整した。作製した緩衝液は室温保存した。

【0057】次に、モノクローナル抗体溶液を用いた試薬の調製方法を示す。モノクローナル抗体には、反応系へのキレート剤、例えば、0.02Mのエチレンジアミン四酢酸の添加によってもヒトCRPに対する結合能を喪失しない、すなわち、ヒトCRPから $\text{Ca}^{2+}$ が脱離したときに、 $\text{Ca}^{2+}$ を保持していないヒトCRPとも特異的に結合する抗体を用いた。

【0058】抗体溶液は次のように調製した。本実施例で用いたマウス抗ヒトCRPモノクローナル抗体は、それを産生するハイブリドーマ細胞（工業技術院生命工学

工業技術研究所受託番号FERM BP-6620号)をマウス腹腔内に注入し、増殖させることにより得られた腹水より、実施例1と同様のカラムクロマトグラフィー法を用いて精製した。

【0059】腹水については、次のようにして得た。腹水の産生には、リタイアしたメスのBALB/cマウスを用いた。また、腹腔内に注入したハイブリドーマ細胞懸濁液は、RPMI1640培地（SIGMA製）に5~15体積%のウシ胎児血清を混合した培地を用いた培養により増殖させたものを、RPMI1640培地で遠心洗浄し、 $1 \times 10^5 \sim 10^7$  cells/mlの濃度になるようにRPMI1640培地に再懸濁して得た。マウスの腹腔内に0.5~1mlのプリスタンを注入し、約7日後に上記細胞懸濁液を0.5~1ml注入した後、腹水産生の見られたマウスより順に腹水を採取した。

【0060】カラムクロマトグラフィーによる精製を終えた抗体試料は、分画分子量1万の透析チューブに入れ、約100倍容量の0.04重量% $\text{NaN}_3$ を含むPBS緩衝液（8g/l  $\text{NaCl}$ 、0.2g/l  $\text{KCl}$ 、1.15g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH7.4）で数回透析して、緩衝液成分を置換した。続いて、抗体濃度を280nmの吸光度測定により推定し、透析で用いたものと同じ緩衝液で調整して抗体濃度を1.0mg/mlとし、これを抗体溶液とした。

【0061】トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む緩衝液の調製は次のようにして行った。トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩には、クエン酸及びtrans-アコニット酸を使用し、2種類の緩衝液を構成した。本実施例の場合、抗体がヒトCRPの $\text{Ca}^{2+}$ 保持の有無による構造変化の影響を受けないため、緩衝液には $\text{Ca}^{2+}$ を添加しなかった。

【0062】クエン酸を用いた緩衝液の構成方法は次のようにした。最終濃度で、クエン酸一水和物を0.05M、ポリエチレングリコール6000を4重量%になるように計量し、調製目的体積の約90%の純水で溶解した。これにNaOH水溶液を添加してpHを4.5に調整し、純水で目的体積に調整した。作製した緩衝液は室温保存した。

【0063】trans-アコニット酸を用いた緩衝液の構成方法は次のようにした。最終濃度で、trans-アコニット酸が0.05M、ポリエチレングリコール6000を4重量%になるように計量し、調製目的体積の約90%の純水で溶解した。これにNaOH水溶液を添加してpHを4.5に調整し、純水で目的体積に調整した。作製した緩衝液は室温保存した。

【0064】なお、上記で作製した各抗体溶液の濃度は、特にこれらに限定されるものではない。作製した抗体溶液は室温でも保存することができるが、抗体の変性

防止の点からは、より低温保存が好ましく、4℃で保存することがより好ましい。

【0065】以上のように構成したトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む緩衝液の少なくとも一方を抗体溶液と組み合わせることにより、免疫反応用試薬を構成することができる。

【0066】実施例1及び2で構成した試薬の使用方法は、反応系を形成させるために、抗原を含む試料（検体）、抗体溶液、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む緩衝液を混合して使用する。混合方法は任意の方法によればよい。混合する比率は、必要とする抗原濃度の測定範囲に応じて決定することができる。混合により形成された反応系で生じた抗原と抗体の結合による免疫反応を測定することにより、検体中の抗原濃度を知らることができる。

【0067】混合により、緩衝剤、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩、ポリエチレングリコール6000などの添加剤の濃度が初期濃度より希釈されるが、希釈された濃度と初期濃度との差が10%程度までなら、得られる測定結果は、初期濃度より予想された測定結果とは大差がなく多大な影響を受けない。また、希釈による濃度変化を回避するために、混合による希釈を考慮して、混合時に試薬中の各物質の濃度が目的濃度になるように調製することもできる。

【0068】なお、実施例1及び2では示さなかったが、抗体をラテックス、金コロイド、磁気微粒子などの微粒子担体に固定化させるか、あるいは、抗体に酵素、色素、蛍光物質、発光物質などを標識してもよい。

【0069】抗体溶液の緩衝剤成分及びpHは、上記組成及びpHに限定されず、例えば、一液系の試薬を構成する場合は、抗体溶液にトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含ませるため、および反応系のpHを酸性に維持するために、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む酸性緩衝液で透析を行えばよい。

【0070】実施例1及び2では、pH調整にNaOHを使用した。KOH、LiOH、NH<sub>4</sub>OH、Ca(OH)<sub>2</sub>、Mg(OH)<sub>2</sub>などの水酸化物を使用してもよい。

【0071】また、実施例1及び2では、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む緩衝液の調製にクエン酸一水和物およびtrans-アコニット酸を使用した。他のトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩であってもよく、例えば、イソクエン酸、無水クエン酸、クエン酸三ナトリウム、クエン酸三ナトリウム二水和物、クエン酸二水素カリウム、クエン酸三ナトリウム一水和物、クエン酸三アンモニウム、クエン酸水素二アンモニウム、クエン酸カルシウム四水和物、クエン酸マグネシウム九水和物、クエン酸リチウム四水和物、クエン酸銅(II)2.5水和物、DL-イソクエン酸三ナトリウム、cis-アコニット酸無水物のいずれかをを用い

てもよい。また、これらを組み合わせて使用することもでき、その場合のpH調整は、純水に溶解時のpHが調整目的とするpHよりアルカリ側の場合はHClなどを、酸性側の場合は上記で示した水酸化物などを利用して行えばよく、また、上記で例示したトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の混合比を調整して行ってもよい。

【0072】また、実施例1及び2では、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む緩衝液の主たる緩衝能をトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩によって付与した場合の作製方法を示したが、試薬に添加されるべき濃度は特に限定されるものではない。また、他の緩衝剤を利用して試薬の主たる緩衝能を付与するか、あるいはトリカルボン酸と他の緩衝剤を協調させて緩衝能を付与してもよい。

【0073】（実施例3）本実施例では、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む酸性反応系の抗原抗体反応に対する効果を、免疫反応測定方法で一般的に使用されている中性反応系と対比した内容について示す。対比は、ヒトアルブミンを免疫比濁法により測定して行った。トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む酸性反応系を構成するための試薬は、実施例1で構成したものをを用いた。

【0074】以下、各トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を含む緩衝液の中で、実施例1で作製したような、クエン酸またはその塩を含み、これらを主たる緩衝剤として使用している類似の組成の緩衝液をクエン酸緩衝液、trans-アコニット酸またはその塩を含み、これらを主たる緩衝剤として使用している類似の組成の緩衝液をアコニット酸緩衝液と称する。

【0075】また、比較例として、中性反応系を構成するための緩衝液の構成にはモブスを使用し、その濃度および緩衝液のpHには一般的によく用いられるものを採用し、0.05Mモブス、4重量%ポリエチレングリコール6000、pH7.4の組成とした。以下、モブス緩衝液と称する。抗体溶液は、クエン酸緩衝液、アコニット酸緩衝液のものと共通のものをを用いた。

【0076】抗原に用いたヒトアルブミン（和光純薬工業製）は、0.05Mモブス、pH7.4の組成の緩衝液に、濃度が0.5、1.0、3.0、5.0、10.0mg/dlになるように溶解した。抗体及び試料である抗原溶液は使用時まで4℃で保存し、各緩衝液は室温で保存した。

【0077】測定装置は自作のものを使用し、次のように構成した。光源は270Hzで変調した波長680nmの射出出力15mW半導体レーザーポインタ（キヨー技研製、型番MLXS-D-12-680-35）とし、検出器は、可視赤外精密測光用シリコンフォトダイオード（浜松フォトニクス製、型番S2387-66

R）とした。セルは厚さ0.1cmの光学ガラス板を張

り合わせ、容量約200 $\mu$ lの正四角柱形に構成した。各配置は、光源より0.5cmのところに、その一面が光源と垂直になるようにセルを配置し、検出器は、光源と90°の角度を成す方向で、セルより5.5cm離れた場所に配置し、検出器に迷光が入射しないように、検出器とセルとの間には遮光筒を設けた。検出器により検知された光量に依存した電流信号は、電流電圧変換回路(10<sup>4</sup>V/A)およびオペアンプによる増幅回路を経て100倍の電圧信号に増幅した後、ロックインアンプ(エヌエフ回路設計ブロック製、型番5610B)を通して位相敏感検波し、GPIB制御によりコンピュータに取り込めるようにした。

【0078】各緩衝液について、各濃度のヒトアルブミンに対する測定は次のようにして行った。反応系の混合比は、緩衝液が178 $\mu$ l、ヒトアルブミン溶液が9 $\mu$ l、抗体溶液が7 $\mu$ lとした。反応系における抗体およびヒトアルブミンの最終濃度は、抗体が約0.11mg/ml、ヒトアルブミンが、測定に使用したヒトアルブミン溶液の濃度に0.046を乗じたものになる。

【0079】まず、セル内に緩衝液とヒトアルブミン溶液を上記容量で加えて、攪拌混合し、続いて、抗体溶液を上記容量で加えて攪拌混合し、抗原抗体反応を生じさせた。散乱光の測定は、抗体溶液を加える10秒前から開始し、0.5秒間隔で300秒間継続した。測定値は電圧値として得られた。セルの汚れが測定に与える影響は、各反応の測定前にセル中に純水を入れて測定し、測定値を補正することにより除いた。得られた各時間における測定値の200~300秒の間の平均値を求め、これを各濃度のヒトアルブミン溶液における測定値とした。また、抗体溶液を加えるまでの10秒間の測定値より、抗原による自己凝集が生じたと判断できた場合は、それらの平均値を上記で求めた各濃度のヒトアルブミン溶液における測定値より差し引いた。測定は室温(約20°C)で行った。

【0080】各緩衝液、抗体溶液、各濃度のヒトアルブミン溶液の混合による反応系のpHへの影響を見るために、測定終了後、pH計(新電元工業製、商品名pHBOY-P2)で、混合液のpH測定を行った。

【0081】結果について述べる。各測定に使用した各緩衝液、抗体溶液、各濃度のヒトアルブミン溶液からなる混合液のpHは、緩衝液のpHと同一であった。

【0082】図1は各緩衝液について、100mg/dlまでの各濃度のヒトアルブミン溶液を測定した結果をプロットしたものである。縦軸は電圧値を表し、横軸は測定に使用したヒトアルブミン溶液の濃度で示した。測定電圧値が高い程、検出器に入射した散乱光が多いことを表しており、反応系の濁度が高いことを示し、抗原抗体反応による抗原-抗体複合体が多く形成されたことを示している。プロットされた各値は、各緩衝液について得られた各濃度のヒトアルブミン溶液の測定値より、同

じ緩衝液でのヒトアルブミンを含まない場合の測定値(0mg/dl)を差し引いたものである。

【0083】図1より、比較例であるモブス緩衝液を用いて抗原抗体反応を測定した場合より、クエン酸緩衝液及びアコニット酸緩衝液を用いて測定した場合の方が明らかに高い測定値を示した。また、モブス緩衝液を用いた場合は、30mg/dl付近をピークとして抗原過剰領域で生じる地帯現象により、測定値は大きく減少を示したが、クエン酸緩衝液を用いた場合は、30mg/dl付近をピークとすることはモブス緩衝液の場合と同じであるが、抗原過剰領域で生じる地帯現象による測定値の減少が抑えられていた。また、アコニット酸緩衝液を用いた場合は、ピークに到達する濃度が若干変化しているように見え、また、抗原過剰領域で生じる地帯現象による測定値の減少がクエン酸緩衝液を用いた場合よりも、さらに抑えられていた。

【0084】以上の結果より、本発明の免疫反応測定方法により、抗原抗体反応の測定値を向上させ得ることが確認できた。また、これにより抗原過剰領域で生じる地帯現象を緩和させ得ることが確認できた。

【0085】また、本発明の免疫反応用試薬により、抗原抗体反応の測定値を向上させ得ることが確認できた。また、これにより抗原過剰領域で生じる地帯現象を緩和させ得ることが確認できた。

【0086】臨床検査では、糖尿病性腎症の早期診断マーカーとして、尿中に排泄される微量なアルブミンが測定対象となっており、0.1~20mg/dlの範囲を定量領域としている測定法及び試薬が多い(新・糖尿病性腎症 発症予防と進展防止のために、繁田幸雄、海津嘉蔵 編集、第131頁(1992)参照のこと)。免疫比濁法による測定及びそれに用いられる試薬を構成する、従来の中性緩衝液では、抗原過剰領域で生じる地帯現象を排除するためには、均一系の免疫反応は一種の平衡反応であることを利用し、抗体濃度を増すか、あるいは、希釈などにより、抗原濃度を低下させることにより解決する必要があるが、本発明の免疫反応測定方法及び免疫反応用試薬を適用すれば、より低い抗体濃度で、抗原の希釈を必要としない抗原過剰領域で生じる地帯現象を排除するヒトアルブミン測定方法および測定用試薬を提供することが可能である。例えば、本実施例での測定結果をもとにすると、20mg/dlの測定値以上を陽性値とする判定領域を設けることにより、従来の中性緩衝液系での測定に比べて、より広い濃度範囲のヒトアルブミンを抗原過剰領域で生じる地帯現象の影響を考慮することなく測定することができる。

【0087】(実施例4)次に、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩としてクエン酸及びtrans-アコニット酸を用い、抗原抗体反応に対する効果のpH依存性を、免疫比濁法により調べた内容について述べる。被測定物質としてはヒトアルブミンを用いた。ヒトアル

ブミン溶液の調製は、実施例3と同様の方法により行い、濃度は0、5、10、30、50、100mg/dlのものを用意した。抗体溶液は、実施例1と同様のものを用いた。

【0088】クエン酸についてのpH依存性を調べるために、0.05Mクエン酸及び4重量%ポリエチレングリコール6000を含む溶液と、0.05Mクエン酸三ナトリウム及び4重量%ポリエチレングリコール6000を含む溶液をそれぞれ用意し、両者を混合して、pHが3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0のクエン酸緩衝液を調製した。

【0089】アコニット酸についてのpH依存性を調べるために、0.1M trans-アコニット酸及び4重量%ポリエチレングリコール6000を含む溶液のpHを4.0、4.5、5.0、5.5、6.0にそれぞれ調整したアコニット酸緩衝液を調製した。

【0090】比較例としては、モブス緩衝液を用いた。装置及び測定法は、実施例3と同様である。測定は室温（約20℃）で行った。各緩衝液、抗体溶液、各濃度のヒトアルブミン溶液の混合による反応系のpHへの影響を見るために、測定終了後、pH計で、混合液のpH測定を行った。

【0091】得られた結果を図2及び3に示す。各測定に使用した各緩衝液、抗体溶液、各濃度のヒトアルブミン溶液からなる混合液のpHは、緩衝液のpHと同一であった。

【0092】図2は、各pHのクエン酸緩衝液について100mg/dlまでの各濃度のヒトアルブミン溶液を測定した結果をプロットしたものである。縦軸は電圧値を表し、横軸は測定に使用したヒトアルブミン溶液の濃度で示した。図3は、各pHのアコニット酸緩衝液について100mg/dlまでの各濃度のヒトアルブミン溶液を測定した結果をプロットしたものである。図2と同様に、縦軸は電圧値を表し、横軸は測定に使用したヒトアルブミン溶液の濃度で示した。グラフの見方はいずれも図1と同様であり、プロットされた各値は、各緩衝液について得られた各濃度のヒトアルブミン溶液の測定値より、同じ緩衝液でのヒトアルブミンを含まない場合の測定値(0mg/dl)を差し引いたものである。

【0093】pH4.0～5.5までのクエン酸緩衝液及びpH4.5～5.0までのアコニット酸緩衝液で測定を行ったものが、低濃度域の定量性に多大な支障を生じず、比較例であるモブス緩衝液を上まわる測定値を示した。また、抗原過剰領域で生じる地帯現象による測定値の減少が緩和されていた。その効果は両緩衝液共に、pH4.5で最大となった。

【0094】クエン酸緩衝液の場合、pHが4.0を超えて低下するか、あるいは6.0以上になると、測定値の向上効果は見られず、モブス緩衝液の測定値を下回った。また、抗原過剰領域で生じる地帯現象による測定値

の減少に対する緩和効果も見られなかった。一方、アコニット酸緩衝液ではpH5.5以上になると、測定値の向上効果は見られず、モブス緩衝液の測定値と同程度か、それを下回った。また、抗原過剰領域で生じる地帯現象による測定値の減少に対する緩和効果も見られなかった。

【0095】また、アコニット酸緩衝液ではpHを4.0にすると、非特異的な混濁が増し、低濃度域の定量決定に支障を生じたが、測定値の向上効果は見られ、また抗原過剰領域で生じる地帯現象による測定値の減少に対する緩和効果も見られた。

【0096】以上の結果をまとめると、測定値の向上効果、また、これによる抗原過剰領域で生じる地帯現象による測定値の減少に対する緩和効果の観点から、クエン酸についてはpH4.0～6.0までの間、trans-アコニット酸については、pH4.0～5.5までの間が適していることがわかった。特に、定量性を含めて考えた場合、上記の両効果が最大となるのはpH4.5であり、このpHで使用することが最も有効であることがわかった。

【0097】以上の結果より、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を用いた免疫反応測定法では、pH4.0～6.0の間に反応系のpHを設定することが好ましいことがわかった。また、反応系のpHを4.5に設定することにより、最大の効果を得ることができるとがわかった。

【0098】また同様に、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を用いた免疫反応測定用試薬では、抗原抗体反応が生じる時のpHが4.0～6.0の間に設定されるように調製することが好ましいことがわかった。また、抗原抗体反応が生じる時のpHを4.5に設定されるように調製することにより、最大の効果を得ることができるとがわかった。

【0099】(実施例5)次に、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩として、クエン酸及びtrans-アコニット酸を用い、抗原抗体反応に対する効果のトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度に対する依存性を免疫比濁法により調べた内容について示す。

【0100】被測定物質としてはヒトアルブミンを用いた。ヒトアルブミン溶液の調製は、実施例3と同様の方法により行い、クエン酸について存在濃度依存性を調べた実験では、0、5、10、30、50、100mg/dlの濃度ものを用意し、trans-アコニット酸について存在濃度依存性を調べた実験では、0、10、20、30、40、60、80、100、200mg/dlの濃度ものを用意した。抗体溶液は、実施例1と同様のものを用いた。

【0101】クエン酸について存在濃度依存性を調べるために、クエン酸濃度がそれぞれ、0.01、0.02、0.1、0.2、0.3Mで、それぞれに4重量%

ポリエチレングリコール6000を含むpH4.5の各クエン酸緩衝液を用意した。

【0102】trans-アコニット酸について存在濃度依存性を調べるために、trans-アコニット酸濃度がそれぞれ、0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.3Mで、それぞれに4重量%ポリエチレングリコール6000を含むpH4.5の各trans-アコニット酸緩衝液を用意した。

【0103】比較例としては、モブス緩衝液を用いた。装置および測定法に関しては、trans-アコニット酸緩衝液での測定の場合に、検出器により検知された光量に依存した電流信号を約70倍の電圧信号に増幅した以外は、実施例3と同様である。測定は室温(約20℃)で行った。各緩衝液、抗体溶液、各濃度のヒトアルブミン溶液の混合による反応系のpHへの影響を見るために、測定終了後、pH計で、混合液のpH測定を行った。

【0104】結果について示す。各測定に使用した各緩衝液、抗体溶液、各濃度のヒトアルブミン溶液からなる混合液のpHは、0.01および0.02Mのクエン酸緩衝液及びtrans-アコニット酸緩衝液を使用したもので、それぞれ、pH4.8、4.7に変化していたが、他は緩衝液のpHと同一であった。上記pH変化は、実施例4の結果より、本実施例の結果に与える影響は少ないと考え、無視した。

【0105】図4は各濃度のクエン酸緩衝液について100mg/dlまでの各濃度のヒトアルブミン溶液を加えて測定した結果をプロットしたものである。また、図5は各濃度のtrans-アコニット酸緩衝液について200mg/dlまでの各濃度のヒトアルブミン溶液を加えて測定した結果をプロットしたものである。

【0106】いずれの図も縦軸は電圧値を表し、横軸は測定に使用したヒトアルブミン溶液の濃度で示した。グラフの見方は図1と同様であり、プロットされた各値は、各緩衝液について得られた各濃度のヒトアルブミン溶液の測定値より、同じ緩衝液でのヒトアルブミンを含まない場合の測定値(0mg/dl)を差し引いたものである。

【0107】各緩衝液、抗体溶液、ヒトアルブミン溶液の混合により、クエン酸およびtrans-アコニット酸濃度が若干低下するが、10%以下の低下であり、結果を左右する程の大きな影響は与えていないと考えられる。

【0108】クエン酸緩衝液の場合、クエン酸濃度が0.2M以下のものが、比較例であるモブス緩衝液での測定値を上まわる値を示し、測定値の向上効果が確認できた。また、これによる抗原過剰領域で生じる地帯現象による測定値の減少に対する緩和効果も見られた。より低濃度のクエン酸緩衝液ほど、上記効果が高かった。クエン酸濃度が0.3Mになると、モブス緩衝液の測定値

を下回り、測定値の向上効果が見られず、また、抗原過剰領域で生じる地帯現象による測定値の減少に対する緩和効果も見られなかった。

【0109】trans-アコニット酸緩衝液の場合、0.01~0.3Mのすべての濃度で、比較例であるモブス緩衝液での測定値を上まわる値を示し、測定値向上効果が確認できた。また、これによる抗原過剰領域で生じる地帯現象による測定値の減少に対する緩和効果も見られた。これらの効果は0.2M以下でより高くなり、特に、0.1M以下で高く、0.05Mで最大となった。0.2~0.05Mまでの間では、より低濃度のtrans-アコニット酸緩衝液ほど、上記効果が高かった。0.05M以下のものについては、明確な効果の差は確認できなかった。

【0110】以上の結果をまとめると、測定値の向上効果、また、これによる抗原過剰領域で生じる地帯現象による測定値の減少に対する緩和効果の観点から、一般的な中性緩衝液を上まわる効果を得る場合には、クエン酸では0.2M以下の濃度が適しており、trans-アコニット酸では0.3M以下の濃度が適していることがわかった。両物質共に、特に、0.1M以下の濃度で使用するが、その効果を高くすることができ、より好ましいことがわかった。

【0111】以上の結果より、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を用いた免疫反応測定法では、反応系におけるトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度を0.3M以下に設定することが好ましいことがわかった。また、反応系におけるトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度を0.1M以下に設定することにより、より高い効果を得ることができることがわかった。

【0112】また同様に、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を用いた免疫反応測定用試薬では、抗原抗体反応が生じるときのトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度を0.3M以下に設定されるように調製することが好ましいことがわかった。また、抗原抗体反応が生じるときのトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩の濃度を0.1M以下に設定されるように調製することにより、より高い効果を得ることができることがわかった。

【0113】(実施例6)次に、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を他の緩衝液と混合して使用した場合の抗原抗体反応に対する効果を、免疫比濁法により確認した内容について示す。対比はヒトアルブミン測定をもとに行った。ヒトアルブミン溶液の調製は、実施例3と同様の方法により行い、濃度は0.5、10、20、30、50、70、100、200、300、500mg/dlのものを用意した。抗体溶液は、実施例1と同様のものを用いた。トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩には、クエン酸及びtrans-アコニット酸を使用した。これらと共存させる緩衝剤には、コハク酸を



使用し、それぞれ、0.1Mコハク酸、0.02Mクエン酸、4重量%ポリエチレングリコール6000、pH 4.5および、0.1Mコハク酸、0.02M trans-アコニット酸、4重量%ポリエチレングリコール6000、pH 4.5の組成の各緩衝液を構成した。また、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩が存在しない場合の比較例として、0.12Mコハク酸、4重量%ポリエチレングリコール6000、pH 4.5の組成の緩衝液を調製して用いた。

【0114】測定には、分光蛍光光度計（島津製作所製、型番RF-5300PC）を使用した。分光蛍光光度計の試料室に恒温セルホルダ（島津製作所製、型番206-15440）を配置し、恒温水槽（TAITEC製、商品名COOLNIT BATH EL-15）に接続し、温度を25℃に保った水を循環して、測定時の温度を一定に保てるようにした。分光蛍光光度計の測定条件は、励起、蛍光波長を共に670nmとし、蛍光側、励起側共にバンド幅を3nmに、感度は高感度に設定した。

【0115】測定は次のようにして行った。2.87m 1の緩衝液と0.1ml抗体溶液を攪拌混合した後、これに0.03mlのヒトアルブミン溶液を加え攪拌混合した。反応系における抗体およびヒトアルブミンの最終濃度は、抗体が約0.10mg/ml、ヒトアルブミン濃度が、測定に使用したヒトアルブミン溶液の濃度に0.01を乗じたものになる。これを蛍光分析用の石英セルに移し、分光蛍光光度計に設置し、T型熱電対（RSコンポーネンツより入手、型番219-4696）をセル内に浸漬し、ヒトアルブミンを混合後2分間経過した時点より、タイムコース測定で、0.04秒間隔で300秒間測定した。測定中のセル内の温度は、T型熱電対をデジタルマルチサモメータ（アドバンテスト製、型番TR2114）に接続してモニタした。セルの汚れが測定に与える影響は、各反応の測定前にセル中に純水を入れて測定し、補正することにより除いた。測定により得られた200～300秒の間の各測定値の平均値を求め、これを各濃度のヒトアルブミン溶液に対する測定値とした。各緩衝液、抗体溶液、各濃度のヒトアルブミン溶液の混合による反応系のpHへの影響を見るために、測定終了後、pH計で、混合液のpH測定を行った。

【0116】結果について示す。各測定に使用した各緩衝液、抗体溶液、各濃度のヒトアルブミン溶液からなる混合液のpHは、緩衝液のpHと同一であった。また、熱電対測定によって得られた各測定中のセル内の温度は25.5±1℃に保たれていた。

【0117】図6は各緩衝液について500mg/dlまでの各ヒトアルブミン溶液を加えて測定した結果をプロットしたものである。縦軸は散乱光強度を表し、横軸は測定に使用したヒトアルブミン溶液の濃度で示した。

プロットされた各値は、各緩衝液について得られた各濃度のヒトアルブミン溶液の測定値より、同じ緩衝液でのヒトアルブミンを含まない場合の測定値（0mg/dl）を差し引いたものである。

【0118】結果は、クエン酸及びtrans-アコニット酸を含む緩衝液が、比較例であるコハク酸のみからなる緩衝液よりも、測定値が向上しており、効果があることが確認できた。また、これによる抗原過剰領域で生じる地帯現象による測定値減少の緩和効果も見られた。

【0119】以上の結果により、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩を他の緩衝剤と共存させて使用した場合でも効果を有することが確認できた。

【0120】（実施例7）次に、実施例2で作製したヤギ抗ヒトCRPポリクローナル抗体溶液を用いた試薬のヒトCRP測定に対する効果を、免疫反応測定方法で一般的に使用されている中性反応系と対比した結果について示す。測定に用いた各濃度のCRP溶液の調製は、精製ヒトCRP（Chemicon International製、Lot No. 21042246）を、0.05Mモブス、0.04重量%NaN<sub>3</sub>、pH 7.4の組成の緩衝液で希釈して調製した。ヒトCRP溶液の濃度は0.10、20、30、50、70、100、200mg/dlのものを用意した。抗体溶液は、実施例2で作製したポリクローナル抗体溶液を用いた試薬を使用した。トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩が存在しない場合の比較例として、モブス緩衝液を用いた。

【0121】測定には、実施例3で述べたものと同じ構成の装置および測定条件を用いた。また、測定方法および測定データの処理方法などに関しても、抗原溶液が異なる点以外はすべて実施例3で述べたものと同じ方法を用いた。

【0122】反応系における抗体およびヒトCRPの最終濃度は、抗体が約0.036mg/ml、ヒトCRP濃度が、測定に使用したヒトCRP溶液の濃度に0.046を乗じたものになる。

【0123】結果について示す。図7は各緩衝液について200mg/dlまでの各ヒトCRP溶液を加えて測定した結果をプロットしたものである。縦軸は電圧値を表し、横軸は測定に使用したヒトCRP溶液の濃度で示した。グラフの見方は図1と同様であり、プロットされた各値は、各緩衝液について得られた各濃度のヒトCRP溶液の測定値より、同じ緩衝液でのヒトCRPを含まない場合の測定値（0mg/dl）を差し引いたものである。

【0124】図7より、比較例であるモブス緩衝液を用いて抗原抗体反応を測定した場合に比べ、実施例2で作製した、ヤギ抗ヒトCRPポリクローナル抗体溶液、並びに0.02M CaCl<sub>2</sub>及びクエン酸を含む緩衝液から構成される試薬を用いて測定した場合の方が、各濃度

のCRP溶液の測定において明らかに高い測定値を示すことが確認できた。

【0125】(実施例8)次に、実施例2で作製したマウス抗ヒトCRPモノクローナル抗体溶液を用いた試薬のヒトCRP測定に対する効果を、免疫反応測定法で一般的に使用されている中性反応系と対比した結果について示す。

【0126】測定に用いた各濃度のヒトCRP溶液の調製は、実施例7と同様の方法を用いた。ヒトCRP溶液の濃度は0、10、20、30、50、70、100mg/dlのものを用意した。抗体溶液は、実施例2で作製したモノクローナル抗体溶液を用いた試薬を用いた。トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩が存在しない場合の比較例として、モブス緩衝液を用いた。

【0127】トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩としてクエン酸を用いた試薬による測定には、実施例6で述べたものと同じ構成の装置および測定条件を用いた。また、測定方法および測定データの処理方法などに関しても、抗原溶液が異なる点以外はすべて実施例6で述べたものと同じ方法を用いた。

【0128】反応系における抗体およびヒトCRPの最終濃度は、抗体が約0.033mg/ml、ヒトCRP濃度が、測定に使用したヒトCRP溶液の濃度に0.010を乗じたものになる。

【0129】一方、トリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩としてtrans-アコニット酸を用いた試薬による測定には、実施例3で述べたものと同じ構成の装置および測定条件を用いた。また、測定方法および測定データの処理方法などに関しても、抗原溶液が異なる点以外はすべて実施例3で述べたものと同じ方法を用いた。

【0130】反応系における抗体およびヒトCRPの最終濃度は、抗体が約0.036mg/ml、ヒトCRP濃度が、測定に使用したヒトCRP溶液の濃度に0.046を乗じたものになる。

【0131】結果について示す。図8はトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩にクエン酸を用いた試薬による測定結果であり、100mg/dlまでの各ヒトCRP溶液を加えて測定した結果をプロットしたものである。縦軸は散乱光強度を表し、横軸は測定に使用したヒトCRP溶液の濃度で示した。プロットされた各値は、得られた各濃度のヒトCRP溶液の測定値より、同じ緩衝液でのヒトCRPを含まない場合の測定値(0mg/dl)を差し引いたものである。熱電対測定によって得られた各測定中のセル内の温度は25.5±1℃に保たれていた。

【0132】図8より、比較例であるモブス緩衝液を用いて抗原抗体反応を測定した場合は、20mg/dlまでのCRP溶液の測定では、十分な測定値差が得られず、実質的にヒトCRPの濃度差を捉えることができなかった。また、30mg/dl以上の測定値についても

各測定値間の差が少なく、ヒトCRP濃度に対する分解能は低かった。一方、クエン酸を用いた試薬で測定した場合は、各濃度のヒトCRP溶液測定において明らかに高い測定値を示し、20mg/dlまでのヒトCRP溶液の測定においても、ヒトCRPの濃度差を捉えることができた。

【0133】図9はトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩にtrans-アコニット酸を用いた試薬による測定結果であり、100mg/dlまでの各ヒトCRP溶液を加えて測定した結果をプロットしたものである。縦軸は電圧値を表し、横軸は測定に使用したヒトCRP溶液の濃度で示した。グラフの見方は図1と同様であり、プロットされた各値は、各緩衝液について得られた各濃度のヒトCRP溶液の測定値より、同じ緩衝液でのヒトCRPを含まない場合の測定値(0mg/dl)を差し引いたものである。

【0134】図9より、比較例であるモブス緩衝液を用いて抗原抗体反応を測定した場合は、10mg/dlまでのヒトCRP溶液の測定では、十分な測定値差が得られず、実質的にヒトCRPの濃度差を捉えることができなかった。一方、trans-アコニット酸を用いた試薬で測定した場合は、各濃度のヒトCRP溶液測定において明らかに高い測定値を示し、10mg/dlまでのヒトCRP溶液の測定においても、ヒトCRPの濃度差を捉えることができた。

【0135】以上の実施例7及び8で示したように、本発明の免疫反応測定方法及びそれに用いる免疫反応測定用試薬が、ヒトCRP測定に対しても測定値の向上効果を持つことが確認できた。

【0136】

【発明の効果】以上説明したように、本発明により、容易に測定値の向上が可能な免疫反応測定方法及びそれに用いる免疫反応測定用試薬を提供することができる。さらに、抗原過剰領域で生じる地帯現象を緩和することが可能な免疫反応測定方法及びそれに用いる免疫反応測定用試薬も提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例における免疫反応測定用試薬を用いた免疫反応測定方法と比較例について、免疫比濁法によるヒトアルブミン測定を行った結果を示すグラフ

【図2】本発明の他の実施例におけるクエン酸を含む免疫反応測定用試薬を用いた免疫反応測定方法について、免疫比濁法によるヒトアルブミン測定におけるpH依存性を調べた結果を示すグラフ

【図3】本発明の同実施例におけるtrans-アコニット酸を含む免疫反応測定用試薬を用いた免疫反応測定方法について、免疫比濁法によるヒトアルブミン測定におけるpH依存性を調べた結果を示すグラフ

【図4】本発明のさらに他の実施例におけるクエン酸を含む免疫反応測定用試薬を用いた免疫反応測定方法につ



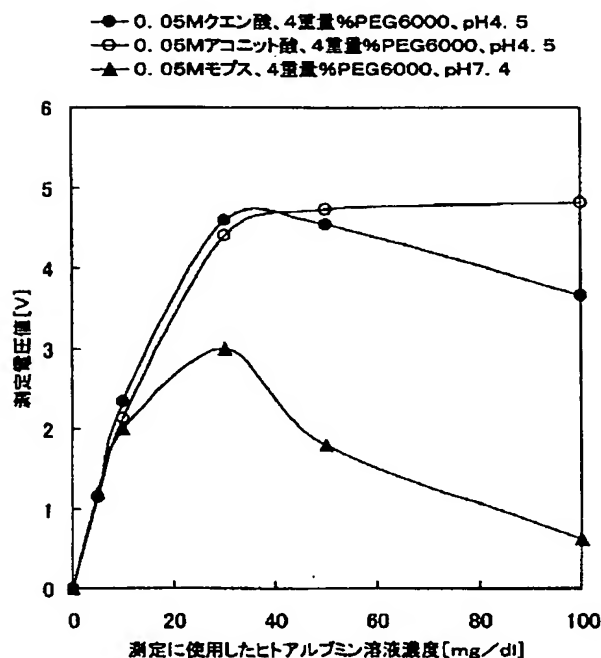
いて、免疫比濁法によるヒトアルブミン測定におけるクエン酸濃度に対する依存性を調べた結果を示すグラフ

【図5】本発明の同実施例におけるtrans-アコニット酸を含む免疫反応測定用試薬を用いた免疫反応測定方法について、免疫比濁法によるヒトアルブミン測定におけるtrans-アコニット酸濃度に対する依存性を調べた結果を示すグラフ

【図6】本発明のさらに他の実施例におけるトリカルボン酸またはトリカルボン酸の塩と他の緩衝剤とを含む免疫反応測定用試薬を用いた免疫反応測定方法と比較例について、免疫比濁法によるヒトアルブミン測定を行った結果を示すグラフ

【図7】本発明のさらに他の実施例におけるヤギ抗ヒトCRPポリクローナル抗体とクエン酸とを含む免疫反応\*

【図1】

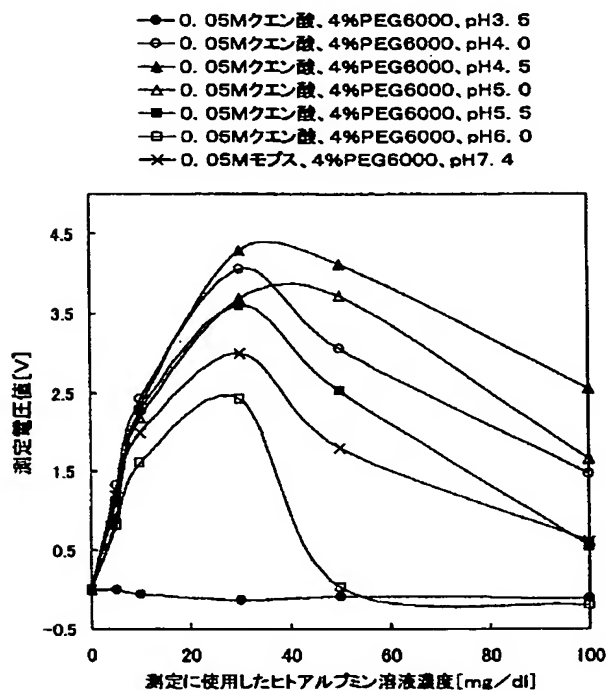


\* 測定用試薬を用いた免疫反応測定方法と比較例について、免疫比濁法によるヒトCRP測定を行った結果を示すグラフ

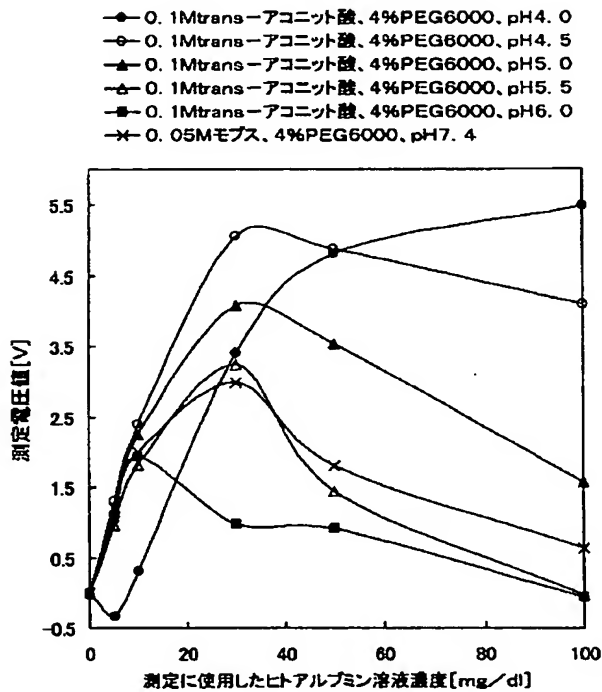
【図8】本発明のさらに他の実施例におけるマウス抗ヒトCRPモノクローナル抗体とクエン酸とを含む免疫反応測定用試薬を用いた免疫反応測定方法と比較例について、免疫比濁法によるヒトCRP測定を行った結果を示すグラフ

【図9】本発明の同実施例におけるマウス抗ヒトCRPモノクローナル抗体とtrans-アコニット酸とを含む免疫反応測定用試薬を用いた免疫反応測定方法と比較例について、免疫比濁法によるヒトCRP測定を行った結果を示すグラフ

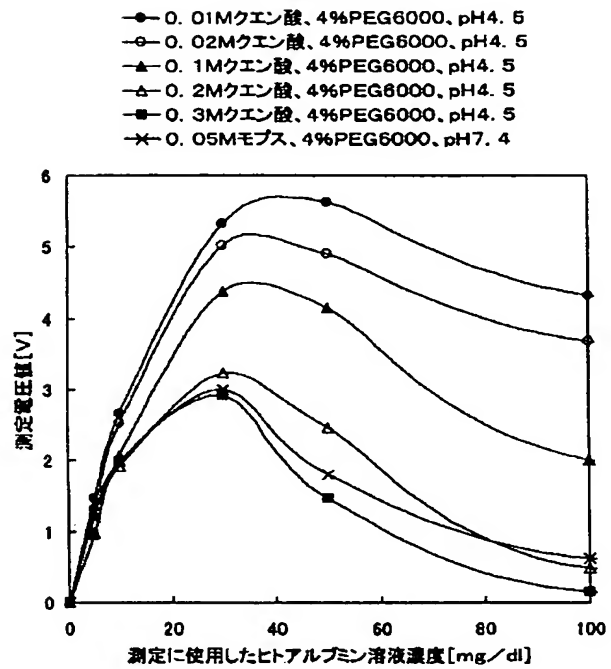
【図2】



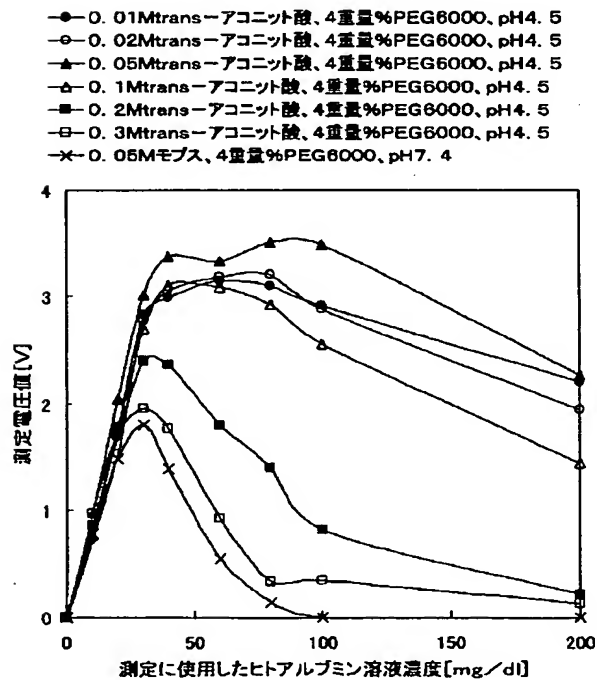
【図3】



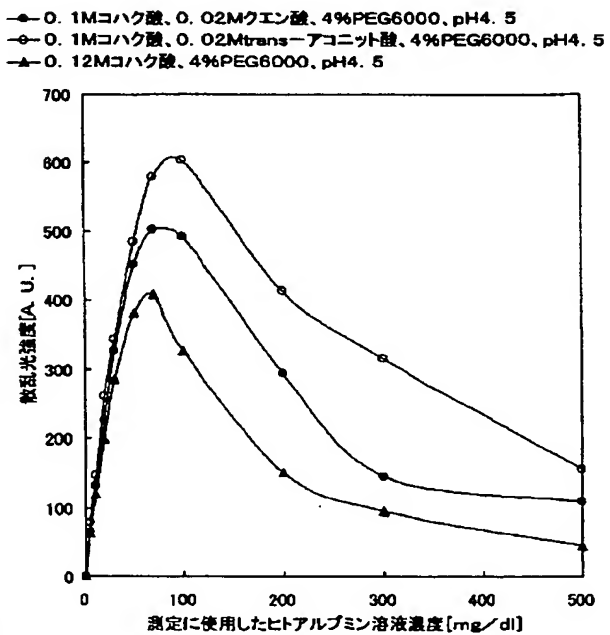
【図4】



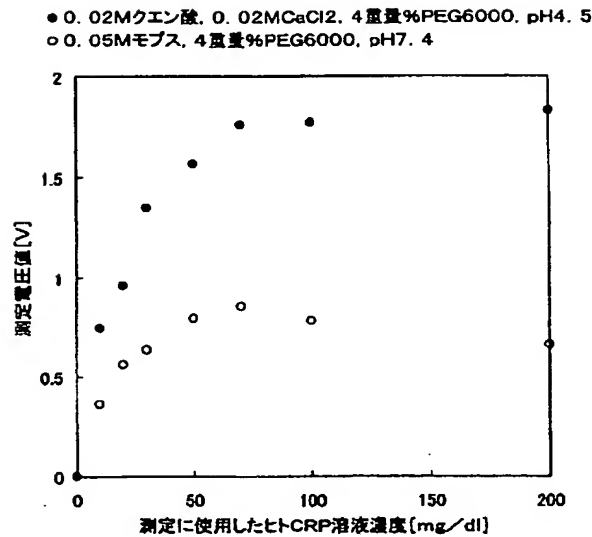
【図5】



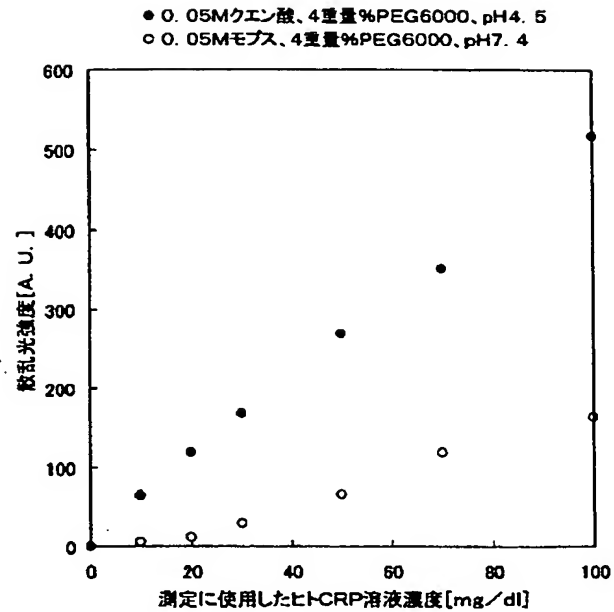
【図6】



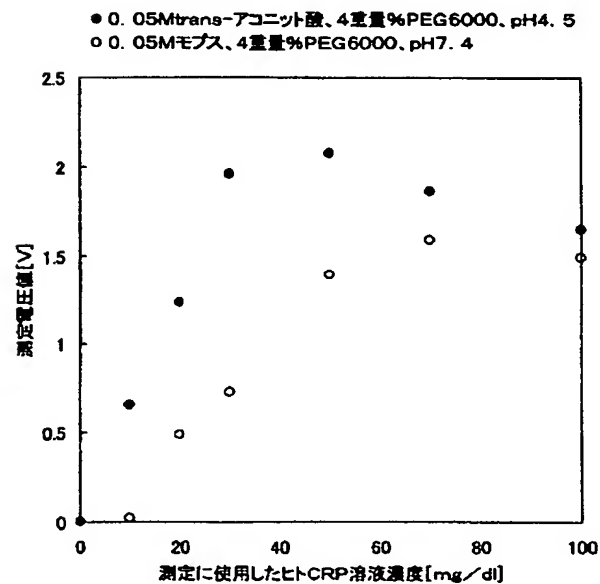
【図7】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(72)発明者 河村 達朗  
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72)発明者 平井 真人  
大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内